

Constituintes fitoquímicos e atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Cnicus benedictus* Linneau, Asteraceae

Componentes fitoquímicos y actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Cnicus benedictus* Linneau, Asteraceae

Phytochemical components and antibacterial activity of ethanolic extract of *Cnicus benedictus* Linneau, Asteraceae

Valdicley Vieira Vale¹ <https://orcid.org/0000-0001-6570-4875>

Caio Nunes Souza² <https://orcid.org/0000-0003-2272-8628>

José Fábio França Orlanda^{2*} <https://orcid.org/0000-0002-6402-6192>

¹Faculdade de Imperatriz (FACIMP). Maranhão, Brasil.

²Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL). Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnológicas (CCENT). Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABITEC). Maranhão, Brasil.

* Autor pra correspondência: fabio.franca@uemasul.edu.br

RESUMO

Introdução: *Cnicos benedictus* Linneau, popularmente conhecida como cardo-santo, cardo-mariano ou cardo-bento, é uma uma espécie comumente empregada na medicina popular no tratamento de diversas doenças, sem a comprovação científica da sua eficiência.

Objetivo: Avaliar a atividade antibacteriana e triagem fitoquímica do extrato etanólico de *Cnicos benedictus* Linneau.

Métodos: A atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Cnicos benedictus* Linneau foi realizada pelo método de difusão em discos. Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram determinados usando o teste de microdiluição em caldo, de acordo com as normas da NCCLS. A triagem fitoquímica dos metabólitos secundários foi realizada segundo metodologias de reações químicas cromogênicas ou precipitação.

Resultados: Os resultados mostraram que o extrato bruto apresentou perfil fitoquímico composto por alcaloides, esteroides, fenóis, flavonoides, taninos, triterpenóides e saponinas. As concentrações inibitórias mínimas do extrato variaram entre 32,0 a 205,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em bactérias Gram-positivas. No entanto, nenhuma atividade inibitória foi observada no crescimento das cepas bacterianas Gram-negativas testadas.

Conclusão: O extrato etanólico bruto de *Cnicus benedictus* Linneau tem um potencial antimicrobiano contra o Gram-positivas, tornando-se uma alternativa importante para bioprospecção de novos fármacos com propriedades antibióticas.

Palavras-chave: *Cnicus benedictus* Linneau; bactérias patogênicas; atividade antibacteriana.

RESUMEN

Introducción: *Cnicus benedictus* Linneau, popularmente conocida como cardo, es una especie utilizada en la medicina popular para tratar una variedad de enfermedades, aunque sin evidencia científica de su efectividad.

Objetivo: Evaluar la actividad antibacteriana y el cribado fitoquímico del extracto etanólico de *Cnicus benedictus* Linneau.

Métodos: La actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Cnicus benedictus* Linneau se realizó mediante el método de difusión en disco. Los valores de concentración inhibitoria mínima se determinaron usando la prueba de microdilución en caldo de acuerdo con los estándares NCCLS. El cribado fitoquímico de metabolitos secundarios se realizó de acuerdo con reacciones químicas cromogénicas o metodologías de precipitación.

Resultados: Los resultados mostraron que el extracto crudo presentaba un perfil fitoquímico compuesto por alcaloides, esteroides, fenoles, flavonoides, taninos, triterpenoides y saponinas. Las concentraciones inhibitorias mínimas del extracto variaron de 32,0 a 205,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en bacterias Gram-positivas. Sin embargo, no se observó actividad inhibitoria en el crecimiento de las cepas bacterianas Gram-negativas analizadas.

Conclusiones: El extracto etanólico crudo de *Cnicus benedictus* Linneau tiene potencial antimicrobiano contra los Gram-positivos, lo que lo convierte en una alternativa importante para la bioprospección de nuevos fármacos con propiedades antibióticas.

Palabras clave: *Cnicus benedictus* Linneau; bacterias patógenas; actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Introduction: *Cnicus benedictus* Linneau, popularly known as thistle, is a species used in folk medicine to treat a variety of diseases, although without scientific evidence of its effectiveness.

Objective: To evaluate the antibacterial activity and phytochemical screening of the ethanolic extract of *Cnicus benedictus* Linneau.

Methods: The antibacterial activity of the ethanolic extract of *Cnicus benedictus* Linneau was performed using the disc diffusion method. Minimum inhibitory concentration values were determined using the broth microdilution test in accordance with NCCLS standards. Phytochemical screening of secondary metabolites was performed according to chromogenic chemical reactions or precipitation methodologies.

Results: The results showed that the raw extract presented a phytochemical profile composed of alkaloids, steroids, phenols, flavonoids, tannins, triterpenoids and saponins. The minimum inhibitory concentrations of the extract ranged from 32.0 to 205.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Gram-positive bacteria. However, no inhibitory activity was observed in the growth of the Gram-negative bacterial strains analyzed.

Conclusions: The raw ethanolic extract of *Cnicus benedictus* Linneau has antimicrobial potential against Gram-positives, which makes it an important alternative for the bioprospecting of new drugs with antibiotic properties.

Keywords: *Cnicus benedictus* Linneau; pathogenic bacteria; antibacterial activity.

Recibido: 28/02/2022

Aceptado: 04/01/2022

Introdução

A espécie botânica *Cnicus benedictus* Linneau, também conhecida como cardo-santo, cardo-mariano ou cardo-bento, pertence a família Asteraceae, gênero *Cnicus*, de porte pequeno, 30 a 40 cm de altura, folhas espinhosas, caule avermelhado, bastante ramificada e flores com tonalidade amarelo claro. É uma planta originária da África que se adaptou aos terrenos rochosos e não cultiváveis no nordeste brasileiro.⁽¹⁾

Na medicina popular é indicada para os males do fígado, tônico estomacal, cicatrizante, diurético, tosse e reumatismo. Tem sido amplamente estudada, devido apresentar propriedades antioxidantes, antidepressivas, anti-inflamatórias, antissépticas e antimicrobianas.^(1,2)

Diversas plantas com atividades antimicrobianas são utilizadas como fonte de produtos naturais biologicamente ativos, na produção de medicamentos fitoterápicos que visem oferecer tratamento alternativo, baixo efeito colateral e maior eficiência contra bactérias patogênicas resistentes a antibióticos disponíveis no mercado.^(3,4)

Com isso, o presente trabalho teve como objetivo realizar a triagem fitoquímica e avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato etanólico de *Cnicos benedictus* Linneau, frente a cepas de bactérias patogênicas.

Métodos

Material botânico

As folhas de *Cnicos benedictus* Linneau foram coletadas no município de Imperatriz, estado do Maranhão, Brasil, no horto medicinal da Faculdade de Imperatriz (FACIMP) e identificadas pela equipe do Laboratório de Botânica da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL). A exsicata do vegetal está armazenada no Herbário da UEMASUL, sob o n° 08.2017.

As folhas coletadas foram secas em estufa com circulação de ar a 40 ± 1 °C por 48 h, trituradas em moinho elétrico de facas e armazenadas em recipiente escuro, hermeticamente fechado, até o momento das análises.

Obtenção do extrato etanólico (EEB)

O extrato etanólico bruto (EEB) de *Cnicos benedictus* foi obtido utilizando-se, o processo de maceração em álcool etílico.⁽⁵⁾ Foram pesados 100 g das folhas da planta e colocados em 1 000 mL de álcool etílico a 85 %. Essa mistura foi macerada a temperatura ambiente por 15 dias, ao abrigo da luz, sendo a seguir filtrada, concentrada por meio de evaporador rotativo e armazenada em frasco âmbar estéril a 4 ± 1 °C, para posterior análise.

Investigação fitoquímica qualitativa

A triagem fitoquímica dos metabólitos secundários foi realizada no extrato etanólico bruto (EEB), segundo metodologias adaptadas de *Barbosa et al.*⁽⁶⁾ e *Matos.*⁽⁷⁾

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada utilizando as bactérias padrões Gram-positivas (*Bacillus cereus* 11778; *Bacillus subtilis* 6633; *Listeria monocytogenes* 1911; *Staphylococcus aureus* 25923) e Gram-negativas (*Citrobacter freundii* 8090; *Enterobacter sakazaki* 51329; *Escherichia coli* 25922; *Proteus mirabilis* 25933; *Pseudomonas aeruginosa* 10145; *Salmonella typhi* 566K; *Serratia marcescens* 274; *Serratia odorífera* 3077T) obtidos da *American Type of Culture Collection* (ATCC).

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 h, em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco). O inóculo foi preparado em solução salina, cuja suspensão foi padronizada pelo tubo 0,5 na escala Mc Farland, para se obter suspensão com 1,0 a 5,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹.

Teste de difusão em ágar

A atividade antibacteriana foi verificada pelo método de difusão em disco de papel (tipo 3 com 6 mm de diâmetro) no meio gelosado Müller Hinton (Oxoid).⁽⁸⁾ As suspensões dos microrganismos-teste desenvolvidas em BHI por 24 h (1,0 a 5,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹) foram semeadas na superfície do meio, em placas de Petri, com auxílio de alça de Drigalsky (100 µL/placa). Neste ensaio foram utilizados discos de 6 mm de diâmetro, embebidos com 20 µL de solução do extrato em estudo, nas concentrações de 250,0 a 500,0 µg mL⁻¹. As placas foram incubadas a 35±1 °C durante 24 h. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mm pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas três repetições. Os solventes bem como os diluentes utilizados na dissolução dos extratos foram usados como controle negativo. O antibiótico clorafenicol foi utilizado como fármaco de referência (controle positivo).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Nos ensaios de determinação da concentração mínima inibitória (CIM) foram utilizadas concentrações de 10,0 a 250,0 µg de EEB em 1 mL de meio líquido BHI, aos quais foram

repicadas as cepas bacterianas.⁽⁸⁾ Esses tubos foram acondicionados em estufa bacteriológica em temperatura de 35 ± 1 °C por 24 h. Em seguida foi semeado 10 µL de cada solução em placas contendo o meio de cultura Ágar Müeller-Hinton e novamente mantido em estufa bacteriológica sob as mesmas condições descritas anteriormente. Os resultados foram determinados de acordo com o aparecimento ou não de colônias bacterianas na superfície do meio de cultura.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=5). Análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey foram utilizadas e o valor de *p* menor que 0,05 foram utilizados como nível de significância.

Resultados

O estudo fitoquímico dos extratos brutos (EEB) obtidos das folhas de *Cnicos benedictus* possibilitou a triagem das principais classes de metabólitos secundários, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Triagem fitoquímica do EEB das folhas de *Cnicos benedictus*.

Classes de metabólitos secundários	Resultados
Açúcares redutores	+
Alcalóides (reativo de Bouchardat)	+
Alcalóides (reativo de Dragendorff)	+
Alcalóides (reativo de Mayer)	+
Antraquinonas	-
Catequinas	-
Esteróides e triterpenóides	+
Fenóis e taninos	+
Flavonóides	+
Polissacarídeos	-
Proteínas e aminoácidos	+
Purinas	-
Saponinas	+
Sesquiterpenolactonas e outras lactonas	-

(+): indicativo de presença; (-): indicativo de ausência.

A tabela 2 mostra os resultados das (CIM) do extrato hidroalcoólico de *Cnicos benedictus*. Os resultados foram analisados segundo metodologia proposta por *Aligianis et al.*⁽⁹⁾ sendo

considerada como forte inibição (até 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), moderada (600 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e fraca (acima de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 2 - Concentração mínima inibitória dos EEB de *Cnicos benedictus* contra bactérias Gram positivas e negativas.

Bactérias (ATCC)	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	EEB de <i>C. benedictus</i>	Clorafenicol ^a
Gram Positivas		
<i>Bacillus cereus</i> (11778)	60,0	>1,250
<i>Bacillus subtilis</i> (6633)	43,8	>1,250
<i>Listeria monocytogenes</i> (1911)	32,0	>1,250
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	205,0	>1,250
Gram Negativas		
<i>Citrobacter freundii</i> (8090)	>5,000	>1,250
<i>Enterobacter sakazaki</i> (51329)	>5,000	>1,250
<i>Escherichia coli</i> (25922)	>5,000	>1,250
<i>Proteus mirabilis</i> (25933)	>5,000	>1,250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10145)	>5,000	>1,250
<i>Salmonella typhi</i> (566K)	>5,000	>1,250
<i>Serratia marcescens</i> (274)	>5,000	>1,250
<i>Serratia odorifera</i> (3077T)	>5,000	>1,250
<i>Shigella sonnei</i> (29930)	>5,000	>1,250
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (17802)	>5,000	>1,250

^a: Controle positivo.

O EEB de *Cnicos benedictus* apresentou forte atividade antibacteriana sobre o crescimento das bactérias Gram-positivas e fraca para as Gram-negativas analisadas em condições laboratoriais.

Discussão

A pesquisa de plantas com atividades biológicas comprovadas, se torna um grande aliado da ciência por fornecer comprovações científicas sobre o uso de plantas medicinais, haja vista que a maioria delas são utilizadas pela população sem nenhuma comprovação científica de sua eficácia.⁽¹⁰⁾

A triagem fitoquímica do extrato etanólico (EEB) das folhas de *Cnicos benedictus* evidenciou a presença de alcaloides, esteroides, fenóis, flavonoides, taninos triterpenóides e saponinas, que apresentam atividades antimicrobianas comprovadas.^(11,12,13)

A avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Cnicos benedictus* demonstrou elevada capacidade de inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas em estudo, com valores de CIM variando de 32,0 a 205,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2). O *S. aureus* apresentou menor sensibilidade ao EEB dentre as bactérias Gram-positivas, devido à possível resistência microbiana e baixa ação seletiva contra a estrutura bioquímica da parede celular bacteriana.⁽⁸⁾

Em relação as bactérias Gram-negativas, o EEB não apresentou inibição microbiana em nenhuma das concentrações testadas. Embora, o extrato contenha em sua composição metabólitos secundários com ação antimicrobiana comprovada.

A diferença de atividade antimicrobiana entre as bactérias Gram positivas e negativas estão relacionadas à presença de uma das estruturas da membrana externa das bactérias Gram negativas, que pode impedir a passagem de moléculas com potencial antimicrobiano através desta membrana.⁽⁸⁾

Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com outros estudos realizados com plantas da família Asteraceae. No extrato hidroalcoólico de guaco (*Mikania laevigata*), também não foi evidenciado nenhuma atividade antimicrobiana contra os microrganismos *E. coli* (25992), *P. aeruginosa* (27853), *E. faecalis* (29212) e *E. faecium* (10541). Conforme os autores o resultado foi inesperado, pois na medicina popular o guaco (*Mikania laevigata*) é muito utilizado com finalidades antissépticas.⁽¹³⁾

Os extratos hidroalcoólicos de margarida-de-são-miguel (*Aster lanceolatus* Willd.), também da família Asteraceae, aplicados nos microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 43071), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27283), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) não apresentaram atividade antimicrobiana.⁽¹⁴⁾

No geral as plantas da família Asteraceae não são possuem boa atividade contra bactérias, quando se verifica essa ação ocorre somente contra microrganismos poucos resistentes (Gram-positivos).^(14,15) Com isso, os resultados da presente pesquisa são promissores, visto que o EEB de *Cnicos benedictus* demonstrou atividade antibacteriana frente as bactérias Gram-positivas, o que motiva estudos posteriores para o isolamento e identificação dos princípios ativos responsáveis pela atividade biológica, com potencial de uso na indústria farmacêutica.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Marcelo Francisco da Silva pela identificação e caracterização da espécie vegetal.

Referencial bibliográfico

1. Ying P, Yuqing J, Ali Z, Bin L, Kaiqiang Z, Fei L, *et al.* Two new sesquiterpene lactone glycosides from *Cnicus benedictus*. Natural Product Research. 2017 [acceso: 30/12/2021];31(19):2211-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28287272/>
2. Paun G, Neagu E, Moroeanu V, Albu C, Savin S, Lucian RG. Chemical and bioactivity evaluation of *Eryngium planum* and *Cnicus benedictus* polyphenolic-rich extracts. BioMed Research Internat. 2019 [acceso: 30/12/2021];12:1-10. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/3692605/>
3. Gomes EM, Firmino AV, Pena RC, Almeida SS. Efeito inibitório *in vitro* de extratos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume no controle de *Cylindrocladium candelabrum*. Ciência Florestal. 2018 [acceso: 30/12/2021];28(4):1559-67. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/cflo/a/jPMjdN8SkFNpxVptH3xwp4k/?format=pdf&lang=pt>
4. Bona EA, Pinto FG, Fruet TK, Jorge TC, Moura AC. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. Arquivos Instituto Biológico. 2014 [acceso: 30/12/2021];81(3):218-25. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/aib/a/mwDLMCbVGPRvH4gdFNJMV4F/?format=pdf&lang=pt>
5. Vieira CB, Orlanda JF. Atividade antioxidante e fotoprotetora do extrato etanólico de *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca, Lamiaceae). Rev Cubana Plant Med. 2018 [acceso: 30/12/2021];23(3):1-15. Disponible en: <http://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/626/319>
6. Vale VV, Orlanda JF. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). Scientia Plena. 2011 [acceso: 30/12/2021];7(4):1-6. Disponible en: <https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/341>
7. Matos FJ. Introdução a fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: UFC; 1997.
8. Orlanda JF; Nascimento AR. Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. South African J Botany. 2015 [acceso: 30/12/2021];99:103-6. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629915002628>
9. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J Agricultural Food Chemistry. 2001 [acceso:

- 30/12/2021];49:4168-70. Disponible en:
<https://www.researchgate.net/publication/11789056> Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species
10. Simões CO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JC, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFSC; 2017.
11. Matte AK, Deak AR, Mata PTG. Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana de extratos das flores de *Sambucus nigra* L. (Caprifoliaceae). Rev Bras Plant Med. 2015 [acceso: 30/12/2021];17(4):1049-54. Disponible en:
<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/PtQDn7dDhcvMcK5cRzm9k4g/abstract/?lang=pt>
12. Ventura PA, Jesus JP, Nogueira JR, Galdos AC. Análise fitoquímica e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de diferentes tipos de extratos de *Plantago major* L. (Plantaginaceae). Infarma-Ciências Farmacêuticas. 2016 [acceso: 30/12/2021];28(1):33-9. Disponible en:
<https://www.researchgate.net/publication/299652268> Análise fitoquímica e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de diferentes tipos de extratos de Plantago major L. Plantaginaceae
13. Fernandes EE, Pulwale AV, Patil GA, Moghe AS. Probing regenerative potential of *Moringa oleifera* aqueous extracts using *in vitro* cellular assays. Pharmacognosy Research. 2016 [acceso: 30/12/2021];8(4):231-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27695260/>
14. Baratto L, LangKL, Vanz DC, Reginatto FH, Oliveira JB, Falkenberg M. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. Rev Bras Farmacog. 2008 [acceso: 30/12/2021];18(4):577-82. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/jfbCBbzWWBKK6nLBXZvMmQH/?lang=pt>
15. Gaspari JF, Virtuoso S, Davet A, Cunico MM, Miguel MD, Miguel OG, *et al.* Atividade antibacteriana e antifúngica de extratos etanólicos de *Aster lanceolatus* Willd., Asteraceae. Rev Bras Farmacog. 2006 [acceso: 30/12/2021];16(1):83-7. Disponible en:
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32789/1/atividade-antibacteriana-e-antifungica-de-extratos-etanolicos.pdf>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Valdicley Vieira Vale e José Fábio França Orlanda.

Curación de datos: Valdicley Vieira Vale e José Fábio França Orlanda.

Análisis formal: Valdicley Vieira Vale e José Fábio França Orlanda.

Adquisición de fondos: Valdicley Vieira Vale e José Fábio França Orlanda.

Investigación: Valdicley Vieira Vale, Caio Nunes Souza e José Fábio França Orlanda.

Metodología: Valdicley Vieira Vale e José Fábio França Orlanda.

Administración del proyecto: José Fábio França Orlanda.

Recursos: José Fábio França Orlanda.

Software: Valdicley Vieira Vale e José Fábio França Orlanda

Supervisión: José Fábio França Orlanda.

Validación: Valdicley Vieira Vale e José Fábio França Orlanda.

Visualización: Valdicley Vieira Vale e José Fábio França Orlanda.

Redacción del borrador original: Valdicley Vieira Vale, Caio Nunes Souza e José Fábio França Orlanda.

Redacción, revisión y edición: Valdicley Vieira Vale, Caio Nunes Souza e José Fábio França Orlanda.